



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 7/02, A61K 39/12, 39/145, 39/205		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/06243
			(43) Date de publication internationale: 20 février 1997 (20.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01064		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 8 juillet 1996 (08.07.96)		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 95/09851 10 août 1995 (10.08.95) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FANGET, Bernard [FR/FR]; La Vavre, F-69210 Saint-Germain-sur-l'Arbresle (FR). FRANÇON, Alain [FR/FR]; La Grand Croix, Brullioles, F-69690 Bessenay (FR).			
(74) Mandataire: KERNEIS, Danièle; Pasteur Merieux Sérums et Vaccins, Direction Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).			
(54) Title: METHOD FOR PURIFYING VIRUSES BY CHROMATOGRAPHY			
(54) Titre: PROCEDE DE PURIFICATION DE VIRUS PAR CHROMATOGRAPHIE			
(57) Abstract			
A method for purifying viruses from a cell line culture by chromatography, comprising an anion exchange chromatography step followed by a cation exchange chromatography step and optionally a metal-binding affinity chromatography step. The method is particularly suitable for producing viruses for use in vaccines.			
(57) Abrégé			
L'invention a pour objet un procédé de purification par chromatographie de virus obtenus par culture sur lignées cellulaires. Le procédé consiste à effectuer successivement une étape de chromatographie échangeuse d'anions puis une étape de chromatographie échangeuse de cations, ainsi qu'éventuellement une étape de chromatographie d'affinités par chélation métallique. Le procédé est particulièrement bien adapté à l'obtention de virus pour la fabrication de vaccins.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Biélorus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

PROCEDE DE PURIFICATION DE VIRUS PAR CHROMATOGRAPHIE

L'invention concerne le domaine de la purification de virus, et plus particulièrement la purification de virus obtenus par cultures sur lignées cellulaires.

5

Les récoltes de virus obtenus à partir de cultures sur lignées cellulaires telles que les cellules Vero, contiennent non seulement les virus désirés mais aussi des protéines et de l'ADN provenant des cellules de culture. Or, lorsque les virus sont destinés à certains usages, tels que la fabrication de vaccins, il est indispensable qu'ils soient le plus purs possible. En effet, il existe des normes limitant à 100.10^{-12} g/dose vaccinale la quantité maximale autorisée d'ADN cellulaire dans les vaccins comprenant des produits obtenus à partir de lignées cellulaires continues et hétéroïdes.

10

On connaît dans l'art antérieur des procédés de purification de virus. Ainsi, le brevet US 4 664 912 divulgue notamment un procédé de purification de virus de la rage par centrifugation de zone dans un gradient de sucrose. Un tel procédé présente cependant l'inconvénient d'être difficilement automatisable ; en outre, il nécessite une étape d'inactivation préalable qui peut entraîner entre le virus et l'ADN cellulaire des interactions rendant ensuite plus difficile l'étape d'élimination de cet ADN.

20

Cette référence divulgue également un procédé de purification associant une étape de filtration sur gel et une étape de chromatographie échangeuse d'ions. Un tel procédé de purification ne permet cependant pas d'obtenir une élimination maximale de l'ADN cellulaire.

25

Un but de l'invention est donc de proposer un nouveau procédé de purification de virus à très haut rendement et facilement automatisable.

30

Un autre but de l'invention est de proposer un procédé de purification permettant d'obtenir des virus entiers, non dégradés.

35

Pour atteindre ces buts, l'invention a pour objet un procédé de purification de virus obtenus à partir d'une culture sur lignée cellulaire, consistant à séparer par chromatographie échangeuse d'ions les virus des protéines et ADN cellulaires provenant de la culture, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie échangeuse d'anions et une étape de chromatographie échangeuse de cations.

Selon une caractéristique particulière du procédé selon l'invention, l'étape de chromatographie échangeuse de cations est effectuée après l'étape de chromatographie échangeuse d'anions. On obtient ainsi des rendements d'épuration optimisés par rapport à l'inversion de l'ordre des étapes.

5

Selon un mode particulier de réalisation, le procédé selon l'invention comprend en outre une étape de chromatographie d'affinité par chélation métallique. Ainsi, les quantités d'ADN résiduel sont vraiment réduites au maximum.

- 10 Selon un autre mode préféré de réalisation, le procédé selon l'invention consiste en outre à effectuer toutes les étapes de chromatographie à la même valeur de pH. Il est ainsi possible d'automatiser facilement le procédé et d'en réduire notablement les coûts, tout en maintenant son efficacité.

- 15 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre.

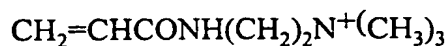
- Les virus à purifier selon le procédé de l'invention sont des virus obtenus grâce à des lignées cellulaires, notamment des lignées cellulaires continues et hétéroplôides et qui sont donc susceptibles d'être associés à des ADN cellulaires. Il peut s'agir
20 notamment de virus rabiques, de virus de l'encéphalite japonaise ou encore de virus de la grippe. Ces virus à purifier peuvent avoir été obtenus par culture sur cellules Vero sur microsupports. Il s'agit par exemple du virus rabique obtenu par culture ainsi que cela est décrit dans le brevet US 4 664 912.

- 25 La récolte de virus est filtrée puis traitée, selon l'invention, par chromatographie échangeuse d'anions et par chromatographie échangeuse de cations.

- La chromatographie échangeuse d'anions peut être une chromatographie échangeuse d'anions faibles réalisée par exemple au moyen de gel comportant le radical diéthylaminoéthyl : gel DEAE Spheredex commercialisé par SEPRACOR, gel
30 DEAE Sepharose commercialisé par PHARMACIA, gel EMD DEAE commercialisé par E. MERCK. On préfère, bien que cela ne soit pas habituel pour l'élimination d'acides nucléiques, utiliser un échangeur d'anions forts tels que un des gels suivants :
35 PHARMACIA, gel EMD TMAE commercialisé par E. MERCK.

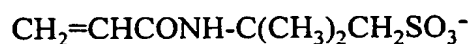
Tous ces gels peuvent être utilisés en tampon TRIS ou en tampon phosphate. De façon avantageuse on utilise un gel qui permet une grande disponibilité du groupement cationique, tel que cela est le cas dans l'EMD TMAE de E. MERCK qui possède des chaînes de 15 à 25 unités de monomère suivant :

5



De même, selon le procédé de l'invention, l'étape de chromatographie échangeuse de cations est de préférence réalisée au moyen d'un gel permettant une grande accessibilité du groupement anionique, tel que cela est le cas dans l'EMD SO_3 commercialité par E. MERCK, qui possède des chaînes de 15 à 25 unités du monomère suivant :

10



15

Ce gel peut également être équilibré au moyen de tampon TRIS ou de tampon phosphate.

Selon un mode préféré de l'invention, on procède à la chromatographie échangeuse d'anions préalablement à la chromatographie échangeuse de cations, l'éluat de la première chromatographie étant, après dilution éventuelle, introduit directement dans la seconde colonne de chromatographie. Cet ordre d'opération permet d'obtenir une optimisation de l'élimination de l'ADN cellulaire.

20

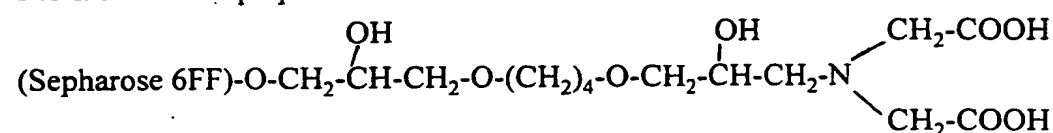
La suspension de virus obtenue par élution de la colonne de chromatographie échangeuse de cations présente un degré de pureté déjà satisfaisant vis-à-vis des normes établies pour l'utilisation des virus dans la fabrication des vaccins.

25

Cependant, selon un mode préféré de l'invention, on adjoint au procédé de purification décrit ci-dessus une étape supplémentaire de chromatographie d'affinité par chélation métallique, en utilisant par exemple l'ion Ca^{2+} comme ion métallique. Cette chromatographie peut être réalisée en utilisant comme support de chélation un gel d'agarose, tel que le gel chelating Sepharose® FF commercialisé par PHARMACIA, qui possède la structure suivante :

30

35



Selon le procédé de l'invention, cette étape de chélation est réalisée en ligne avec les 2 étapes précédentes de chromatographie échangeuse d'ions, l'éluat de l'échangeur de cations étant introduit directement dans la colonne de chromatographie de chélation.

- 5 Lors de cette étape, l'ADN cellulaire reste fixé alors que le virus traverse le gel sans être retenu.

Cette étape additionnelle permet de fixer encore au moins la moitié de l'ADN résiduel qui est certes déjà en très faible quantité mais qui est en revanche, à ce stade,
10 très difficile à éliminer.

La suspension de virus ainsi purifiée est diluée par un stabilisant puis inactivée selon toute méthode connue dans l'art antérieur, par exemple à la β propiolactone, avant d'être concentrée et lyophilisée, pour être ensuite mélangée aux autres récoltes issues
15 de la même culture de cellules VERO et qui vont constituer un même lot de fabrication.

Les vaccins fabriqués à partir de tels virus ont été injectés à l'homme et ont été très bien tolérés. On a, en outre, vérifié leur activité protectrice chez l'animal grâce à un
20 test effectué chez la souris dont les résultats ont été positifs.

De façon surprenante et très avantageuse, selon l'invention, il est possible de réaliser l'ensemble de la purification à température ambiante en ligne et toujours au même pH, ce qui rend le procédé simple, facilement automatisable et sûr ; il est notamment
25 possible de réaliser l'ensemble du procédé dans de bonnes conditions de stérilité.

Grâce à ce procédé de purification, on obtient des virus entiers, non dégradés dont les spicules sont visibles en microscopie électronique, avec un très haut degré de pureté.

30 Exemple 1

On prépare une colonne de chromatographie échangeuse d'anions en introduisant dans une colonne du gel EMD TMAE commercialisé par E. MERCK dans laquelle on fait tout d'abord passer de la soude NaOH 1M dans un but de désinfection. La
35 colonne est ensuite équilibrée en tampon TRIS 20mM à pH 7,5.

On prépare une colonne de chromatographie échangeuse de cations en introduisant dans une colonne du gel EMS SO₃ commercialisé par E. MERCK, dans laquelle on fait également passer de la soude 1M puis du tampon TRIS 20mM à pH 7,5.

- 5 On prépare une colonne de chromatographie d'affinité par chélation métallique en introduisant dans une colonne du gel chelating Sepharose® FF commercialisé par PHARMACIA dans laquelle on fait passer de la soude 1M puis de l'eau, avant de la charger en CaCl₂ à 3g/l ; on rince ensuite à l'eau puis on fait passer du tampon TRIS 20mM NaCl 0,5M à pH 7,5.

10

Exemple 2

- On filtre une récolte de virus rabiques cultivés sur cellules VERO grâce à une membrane dont le seuil de coupure est de 0,65µm puis une membrane dont le seuil de coupure est de 0,45 µm.

15

- Cette récolte est constituée par une suspension de virus dans du milieu de culture comprenant également de l'ADN cellulaire ainsi que des protéines provenant à la fois des cellules VERO et du milieu de culture. La récolte brute filtrée est passée au travers de la colonne de chromatographie échangeuse d'anions préparée selon ce qui est décrit à l'exemple 1. La partie non fixée, contenant des protéines et de l'ADN est recueillie en sortie de la colonne à des fins de dosage. On rince la colonne par du tampon TRIS 20mM NaCl 0,1 M à pH 7,5 puis on élue les virus qui se sont fixés en faisant passer dans la colonne du tampon TRIS 20 mM NaCl 0,4 M à pH 7,5 jusqu'à ce que le pic caractéristique des virus soit passé. L'éluat de la première colonne est dilué au 1/4 en ligne par du tampon TRIS 20mM à pH 7,5 avant d'être introduit dans la colonne de chromatographie échangeuse de cations préparée selon l'exemple 1.

20

25

- La partie non fixée de cette seconde colonne est recueillie à des fins de dosage. Lorsque tout l'éluat de la première colonne contenant du virus est passé au travers de la seconde colonne, on la rince avec du tampon TRIS 20mM NaCl 0,1 M à pH 7,5 puis on procède à l'élution des virus fixés en faisant passer du tampon TRIS 20mM NaCl 0,5M à pH 7,5 jusqu'à ce que le pic caractéristique des virus soit passé.

30

- L'éluat de cette seconde colonne est introduit directement, sans dilution, dans la colonne de chromatographie d'affinité par chélation métallique préparée selon l'exemple 1. Cette fois, l'ADN se complexe aux ions Ca⁺⁺ présents dans la colonne

35

alors que le virus traverse la colonne et est recueilli en sortie pour être associé à un stabilisant et inactivé. L'ADN complexé aux ions Ca^{++} est élué par passage dans la colonne d'une solution EDTA 50mM.

- 5 Les colonnes de chromatographie échangeuses d'ions sont régénérées par passage de tampon TRIS 20mM NaCl 1M à pH 7,5 et désinfectées par de la soude 1M, avant d'être utilisées pour l'épuration des autres récoltes provenant de la même culture qui vont toutes être réunies pour constituer un seul lot de fabrication.

10 Exemple 3

On dose pour chaque récolte, après chaque étape de chromatographie, les quantités de protéines et d'ADN cellulaires épurées.

- 15 Les protéines totales sont dosées grâce à la méthode de Lowry et l'ADN total au moyen de l'appareil THRESHOLD de MOLECULAR DEVICE.

Les résultats obtenus en faisant une moyenne des rendements par étapes pour chaque récolte de la culture, exprimés en pourcentage résiduel pour chacune des étapes du

- 20 procédé d'épuration, sont les suivants :

Rendement (%)	ADN total	Protéines Totales
Colonne échangeuse d'anions	0,02	0,056
Colonne échangeuse de cations	27	25
Colonne d'affinité par chélation métallique	80	

Globalement, grâce au procédé d'épuration selon l'invention, il ne reste plus que 0,004% de l'ADN cellulaire et 1,4 % des protéines présents dans les récoltes brutes.

25

L'épuration réalisée est donc complètement satisfaisante.

On vérifie en outre l'infectivité des virus obtenus à chaque étape, grâce à une mesure de leur titre infectieux en DICC 50 et à une observation au microscope électronique.

- 30 On remarque que l'intégrité du virus est bien conservée tout au long du procédé.

Lorsque les virus ainsi produits sont utilisés dans la fabrication de vaccins contre la rage, il est possible de réaliser des doses ne contenant pas plus de 30 à 40.10⁻¹²g d'ADN cellulaire par dose, soit une quantité nettement inférieure à la norme qui est de 100.10⁻¹²g.

5

Revendications

1. Procédé de purification de virus obtenus à partir d'une culture cellulaire consistant à séparer les virus des protéines et ADN cellulaires provenant de la culture par chromatographie échangeuse d'ions, caractérisée en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie échangeuse d'anions ainsi qu'une étape de chromatographie échangeuse de cations.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les anions sont des anions forts.
3. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cations sont des cations forts.
4. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échange de cations est réalisé après l'échange d'anions.
5. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de chromatographie d'affinité par chélation métallique.
6. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que la chélation métallique est réalisée au moyen d'ions calcium.
7. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les virus à purifier sont obtenus par cultures sur lignées cellulaires continues et hétéroplôides.
8. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les virus à purifier sont obtenus par cultures sur cellules VERO.
9. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les virus à purifier sont des virus rabiques.
10. Procédé selon une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les virus à purifier sont des virus de l'encéphalite japonaise.
11. Procédé selon une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les virus à purifier sont des virus de la grippe.

12. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer toutes les étapes de chromatographie à la même valeur de pH.
13. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
5 procédé en ligne.
14. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est réalisé à température ambiante.
- 10 15. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans des conditions stériles.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N7/02 A61K39/12 A61K39/145 A61K39/205

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,4 664 912 (T.J. WIKTOR ET AL.) 12 May 1987 cited in the application see column 8, line 14 - line 15; claims see column 7, line 20 - line 60 ---	1-15
Y	FR,A,1 441 767 (ROHM & HAAS COMPANY) 1966 see page 2, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 1; claims see page 3, right-hand column, line 45 - line 55; examples 1,6 --- -/--	1-4,7-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 1996

Date of mailing of the international search report

05.11.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter-Application No
PC 1/96/01064

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 51, no. 1, 10 January 1957 Columbus, Ohio, US; abstract no. 530f, H.D. MATHEKA ET AL.: "ION EXCHANGE FOR VIRUS PREPARATIONS. I. INFLUENCE OF THE ION-EXCHANGE PROPERTIES ON THE ADSORPTION OF INFLUENZA VIRUS." XP002000499 see abstract & Z. NATURFORSCH., vol. 11b, 1956, pages 187-193,	1-4,7-15
Y	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 51, no. 1, 10 January 1957 Columbus, Ohio, US; abstract no. 530g, H.D. MATHEKA ET AL.: "ION EXCHANGE FOR VIRUS PREPARATIONS. II. FRACTIONATION OF INFLUENZA VIRUS" XP002000500 see abstract & Z. NATURFORSCH., vol. 11b, 1956, pages 193-199,	1-4,7-15
Y	--- WO,A,95 01797 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 19 January 1995 see page 8, line 29 - line 33; claims see page 10, line 21 - page 11, line 19 see page 18, line 24 - line 25 -----	5,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/FR 96/01064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4664912	12-05-87	NONE	
FR-A-1441767	07-09-66	NONE	
WO-A-9501797	19-01-95	AU-A- 7322994 ZA-A- 9404950	06-02-95 22-02-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No
PCT/PA 96/01064

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N7/02 A61K39/12 A61K39/145 A61K39/205

Sélection classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US,A,4 664 912 (T.J. WIKTOR ET AL.) 12 Mai 1987 cité dans la demande voir colonne 8, ligne 14 - ligne 15; revendications voir colonne 7, ligne 20 - ligne 60 ---	1-15
Y	FR,A,1 441 767 (ROHM & HAAS COMPANY) 1966 voir page 2, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite, alinéa 1; revendications voir page 3, colonne de droite, ligne 45 - ligne 55; exemples 1,6 --- -/--	1-4,7-15

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Octobre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05. 11. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

le Internationale No

/FR 96/01064

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 51, no. 1, 10 Janvier 1957 Columbus, Ohio, US; abstract no. 530f, H.D. MATHEKA ET AL.: "ION EXCHANGE FOR VIRUS PREPARATIONS. I. INFLUENCE OF THE ION-EXCHANGE PROPERTIES ON THE ADSORPTION OF INFLUENZA VIRUS." XP002000499 voir abrégé & Z. NATURFORSCH., vol. 11b, 1956, pages 187-193,</p>	1-4,7-15
Y	<p>--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 51, no. 1, 10 Janvier 1957 Columbus, Ohio, US; abstract no. 530g, H.D. MATHEKA ET AL.: "ION EXCHANGE FOR VIRUS PREPARATIONS. II. FRACTIONATION OF INFLUENZA VIRUS" XP002000500 voir abrégé & Z. NATURFORSCH., vol. 11b, 1956, pages 193-199,</p>	1-4,7-15
Y	<p>--- WO,A,95 01797 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 19 Janvier 1995 voir page 8, ligne 29 - ligne 33; revendications voir page 10, ligne 21 - page 11, ligne 19 voir page 18, ligne 24 - ligne 25 -----</p>	5,6

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem- 'a' ationale No
PC 1, / 96/01064

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A-4664912	12-05-87	AUCUN	
FR-A-1441767	07-09-66	AUCUN	
WO-A-9501797	19-01-95	AU-A- 7322994 ZA-A- 9404950	06-02-95 22-02-95

